

氏 名	小 川 武 利
生 年 月 日	
本 籍	東京都
学 位 の 種 類	博士 (薬学)
学 位 記 番 号	博乙第227号
学位授与の日付	平成13年3月22日
学位授与の要件	論文博士 (学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	血小板放出反応に関する研究
論文審査委員(主査)	二階堂 修 (薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	松永 司 (薬学部・助教授) 正宗 行人 (自然科学研究科・教授) 鈴木 永雄 (自然科学研究科・教授) 宮本 謙一 (医病院・教授)

## 学 位 論 文 要 旨

Involvement of platelet secretion in the progression of atherosclerosis and in secondary platelet aggregation was investigated. The contribution of platelet aggregation in the platelet secretion was also investigated.

Hypercholesterolemic rabbits fed 1% cholesterol for 5 weeks had increased platelet aggregation, and reduced endothelium-dependent vasorelaxation and platelet serotonin (5-HT) content. No obvious changes were observed in vasoconstriction and atherosclerotic lesions. These results suggest a possible association among the endothelial dysfunction, platelet aggregation and platelet secretion in the progression of atherosclerosis.

In cat platelets highly responsible to 5-HT as well as platelets from patients with cardiovascular diseases, U-46619 and PAF caused a biphasic platelet aggregation. A combination of low concentrations of 5-HT and U-46619 or PAF synergistically caused full platelet aggregation. Ketanserin, a 5-HT<sub>2</sub> antagonist, inhibited the second phase of U-46619- and PAF-induced aggregation. These data suggest that 5-HT released during primary aggregation plays a major role in the secondary aggregation.

Collagen, ADP and TRAP caused platelet aggregation and secretion under stirring conditions. GPIIb/IIIa antagonists inhibited platelet aggregation induced by all agonists. These agents completely and partially inhibited secretion by collagen and ADP, but not that by TRAP. Under non-stirring conditions where by aggregation was prevented, collagen, ADP and TRAP produced a 10, 30 and 90% secretion, respectively. These results demonstrated that the contribution of platelet aggregation in platelet secretion varies among agonists and that the rank order for contribution of platelet aggregation in secretion was collagen > ADP >> TRAP.

血小板は粘着、凝集および放出反応を介し、止血および血栓形成において中心的な役割を果たす。血小板は活性化されると放出反応により、細胞内の濃染顆粒と $\alpha$ 顆粒に貯えられた様々な生理活性物質を放出する。従って、血小板放出反応は生理的に重要な役割を担っていると考えられるが、詳細については不明な点が多い。本研究では、血小板放出反応に関して、病態（動脈硬化症発症）との関連、血小板凝集におけるポジティブフィードバック的な役割、放出反応メカニズムについて検討した。

#### 動脈硬化症発症への血小板放出反応の関与<sup>1)</sup>

ウサギは高脂血症およびその延長上にある動脈硬化症を引き起こしやすいことから、両疾患のモデル動物として繁用される。また、他の動物と比較して、ウサギの血小板濃染顆粒内には、血小板活性化作用および血管収縮作用に加え、血管平滑筋細胞増殖促進作用を有すセロトニン (5-HT: 5-hydroxytryptamin) が極めて多く含まれている。動脈硬化病変は血管壁への脂質沈着と平滑筋細胞の増殖によって形成されることから、生体内で放出反応が起こっていれば、放出された 5-HT によって動脈硬化病変形成が促進されることが予想される。そこで、高脂血症ウサギの血小板内 5-HT 含量に着目した。ウサギに 1% コレステロール食を 10 週間負荷することにより、大動脈（大動脈弓から腹部大動脈にかけて）に動脈硬化病変が認められた。一方、5 週間負荷の時点では、高脂血症が誘発され内皮細胞依存性の血管弛緩反応が減弱するものの、組織学的検討から検出できる病変は見出されず、動脈硬化症発症への進行過程と考えられた。この時点において、血小板内 5-HT 含量は低下しており (Figure 1)、生体内で放出反応が起こっていることが強く示唆された。

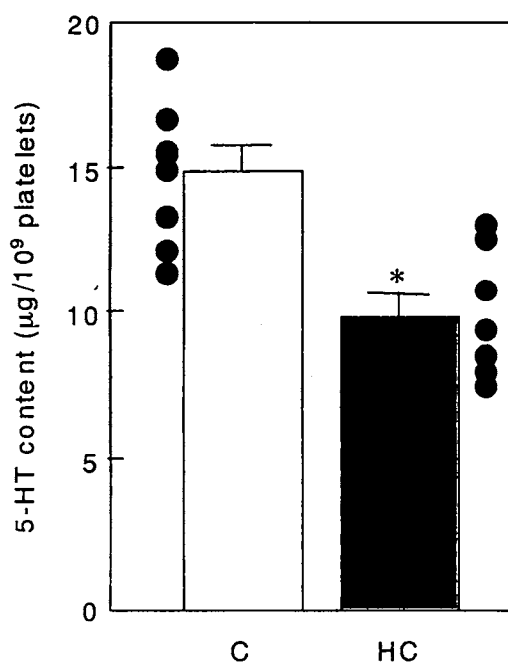


Fig. 1 Platelet 5-HT content in control (C) and hypercholesterolemic (HC) rabbits. Mean  $\pm$  S.E.M. (n=8) and original data (circles) are shown. \*p<0.05 vs. control.

また、ADP (Adenosine 5'-diphosphate)や 5-HT に対する血小板凝集能が亢進していた。ADP および 5-HT は血小板濃染顆粒に貯えられていることから、生体内では放出反応により放出された ADP や 5-HT によって、更なる血小板の活性化が起こっていると予想された。経時的な観察から「血清コレステロールの上昇 (高脂血症)」→「血小板凝集能の亢進」→「血小板内 5-HT 含量の低下 (放出反応の亢進)」→「動脈硬化病変の形成 (動脈硬化症)」の順に変化することを見出した。高脂血症から動脈硬化症への進行には血小板凝集能の亢進による放出反応の亢進 (内因性 5-HT の放出)あるいは放出反応亢進による更なる血小板活性化や血管平滑筋細胞増殖 (血管狭窄)などが複雑に関連し、中でも血小板放出反応はその中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

#### 血小板活性化ポジティブフィードバック機構における血小板放出反応の役割<sup>2)</sup>

ヒトを含め各種動物の血小板は 5-HT 単独では凝集しないが、ヒト血栓症患者の血小板では 5-HT 感受性が亢進していることが報告されている。そこで、5-HT 感受性の高いネコ血小板を用い、内因性 5-HT の血小板凝集における役割を検討した。U-46619 (thromboxane  $A_2$  安定誘導体)刺激により放出反応を伴った 2 相性の凝集反応が惹起された。単独では、小さい可逆的な凝集しか引き起こさない 5-HT と U-46619 を併用することにより、大きく非可逆的な凝集が惹起され、両刺激剤の併用により相乗効果を示すことが明らかとなった。U-46619 刺激凝集に対して、TXA<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である BM-13177 および 5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である ケタンセリンは濃度依存的な抑制作用を示した (Figure 2)。

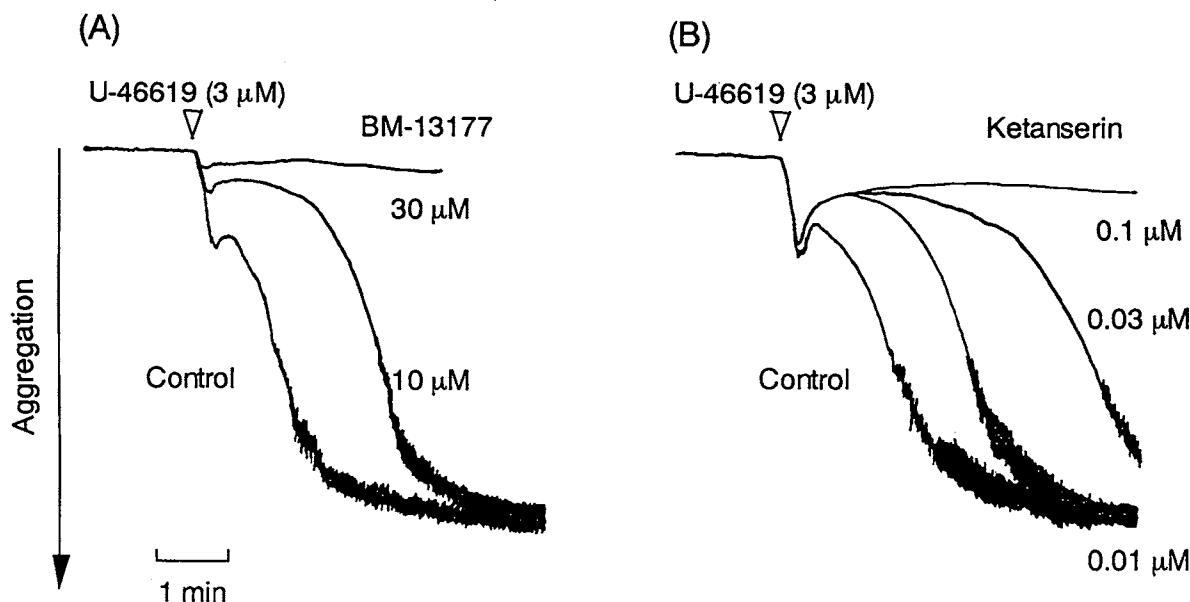
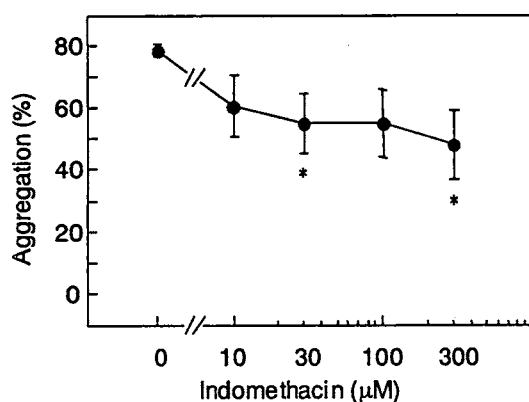


Fig. 2 Typical tracing of platelet aggregation curves by U-46619 (3 μM) and its modification by (A) BM-13177 (10, 30 μM) and by (B) ketanserin (0.01-0.1 μM).

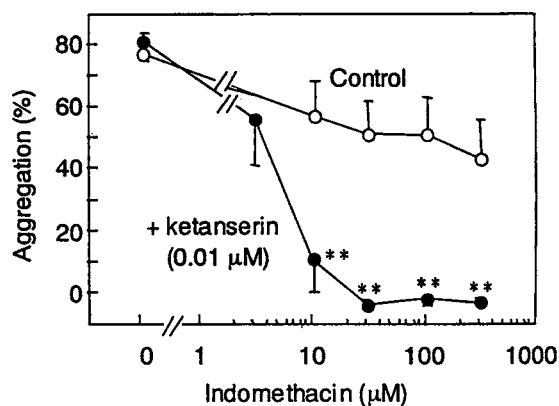
しかしながら、BM-13177 が 1 次凝集を抑制するのに対してケタンセリンは 1 次凝集に対しては全く影響を及ぼさず、2 次凝集のみを抑制した。また、U-46619 刺激血小板凝集に対するケタンセリンの有効濃度域は、5-HT 刺激凝集に対するものとほぼ等しく、ケタンセリンの U-46619 刺激血小板凝集に対する抑制作用は U-46619 刺激で放出された 5-HT に対する拮抗作用によるものであると考えられた。

血小板をコラーゲンで刺激するとシクロオキシゲナーゼを介して  $\text{TXA}_2$  が多量に産生されること、またコラーゲン刺激による血小板凝集は大部分が産生された  $\text{TXA}_2$  に依存すると考えられている。そこで、コラーゲン刺激血小板凝集に対するケタンセリンの作用を検討した (Figure 3B)。

(A) Indomethacin



(C) Ketanserin + Indomethacin



(B) Ketanserin

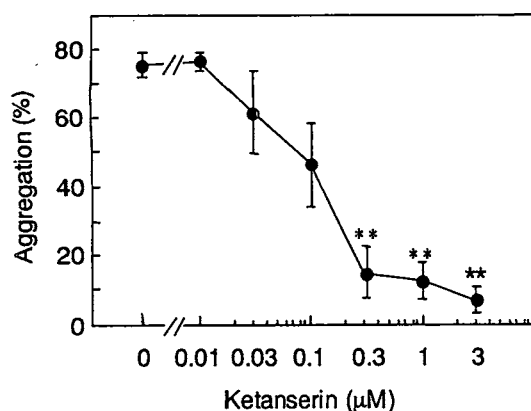


Fig. 3 Effects of (A) indomethacin (10-300  $\mu\text{M}$ ), (B) ketanserin (0.01-3  $\mu\text{M}$ ), and (C) indomethacin (10-300  $\mu\text{M}$ ) in the presence or absence of ketanserin (0.01  $\mu\text{M}$ ) on platelet aggregation induced by collagen (0.6-1  $\mu\text{g/ml}$ ). Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=6-12$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control (open circle).

予想通り、ケタンセリンはコラーゲン刺激血小板凝集を濃度依存的に抑制した。本結果は  $\text{TXA}_2$  そのものが U-46619 と同様に 5-HT 放出を引き起こすこと、放出された 5-HT が  $\text{TXA}_2$  刺激凝集に重要であることを示している。一方、シクロオキシゲナーゼ阻害作用を有するインドメタシンはコラーゲン凝集を抑制すると予想されたが、ヒト健常人血小板のコラーゲン凝集を十分に抑制する濃度を用

いても、ネコ血小板のコラーゲン凝集を部分的にしか抑制しなかった (Figure 3A)。この反応液に単独では作用しない非常に低濃度のケタンセリンを共存させることによって、インドメタシンは濃度依存的にコラーゲン凝集を抑制した (Figure 3C)。本結果は  $\text{TXA}_2$  が産生されるような条件下では、産生された  $\text{TXA}_2$  の刺激によって 5-HT が放出され、放出された 5-HT が凝集反応の主要なメディエーターとなることを示している。

次に、 $\text{TXA}_2$  産生を惹起しない低濃度の PAF (platelet activating factor) を刺激剤として用いたときの放出反応 (内因性 5-HT) の役割について検討した。U-46619 刺激と同様に、5-HT との間に相乗効果を示すこと、ケタンセリンによって部分的な抑制を受けることが示された。PAF で血小板を刺激したときの反応液中 5-HT 量を測定したところ、PAF との間に相乗効果を示す十分量の 5-HT が放出されていることが確認できた (Figure 4)。

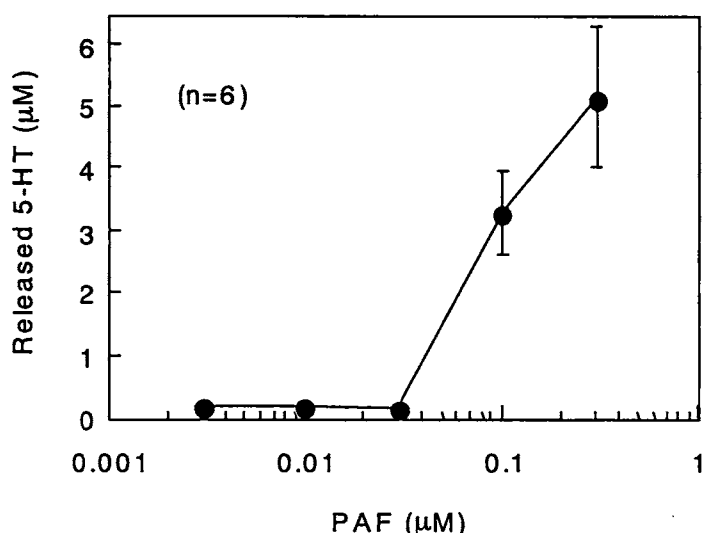


Fig. 4 PAF-induced 5-HT release in cat platelet-rich plasma. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6).

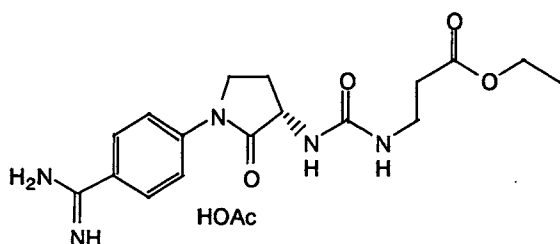
これらの結果は  $\text{TXA}_2$  および PAF で血小板を刺激することにより 1 次凝集と 5-HT の放出が惹起され、放出された 5-HT が 1 次凝集を相乗的に増強し (ポジティブフィードバック機構)、2 次凝集を起こすことを示している。血栓症患者では血小板の 5-HT 感受性が亢進していることが知られており、そのような患者の血小板活性化には放出反応 (放出される内因性 5-HT) が更なる血小板の活性化 (ポジティブフィードバック機構) に重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### GPIIb/IIIa 拮抗薬オルボフィバンの薬理学的プロファイルの検討<sup>3)</sup>

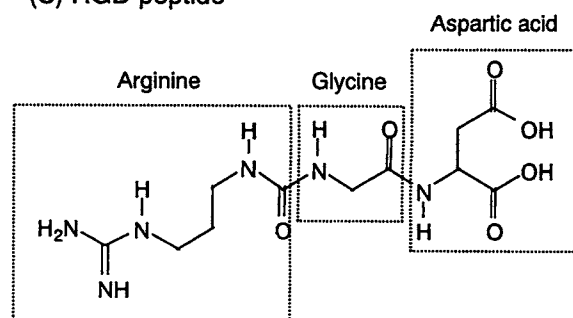
新薬のヒトでの薬効を推定する上で、薬理学的性質を実験動物で確立することは極めて重要とされている。しかしながら、薬によっては作用に動物種差が

認められ、実験動物での評価が困難なものがある。血小板凝集の最終ステップである GPIIb/IIIa (GlycoproteinIIb/IIIa)とフィブリノーゲンの結合を阻害する GPIIb/IIIa 拮抗薬の多くも、薬効評価に比較的繁用されるラット、ハムスターおよびウサギといった小型動物での作用が弱くヒトでの作用を反映しないといった動物種差のある薬剤である。小形動物の中でモルモットは例外で、GPIIb/IIIa 拮抗薬が比較的強力な作用を示すことから、GPIIb/IIIa 拮抗薬の薬効評価動物としてしばしば用いられている。新規 GPIIb/IIIa 拮抗薬オルボフィバン(Figure 5)の薬理学的性質の確立を目指し、モルモットにおける抗血小板作用および抗血栓作用を検討した。

(A) Orbofiban



(C) RGD peptide



(B) SC-57101A

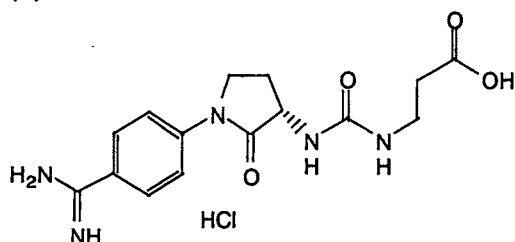


Fig. 5 Chemical structures of orbofiban (A), SC-57101A, an active metabolite sodium salt of orbofiban (B) and RGD peptide (C).

オルボフィバンをモルモットに経口投与することにより、体内で活性体 SC-57101A に変換され、GPIIb/IIIa 拮抗作用に基づき、さまざまなアゴニスト-惹起血小板凝集を同等に抑制した。オルボフィバンの抗血小板作用は持続的で、このことは活性体血中濃度推移からも確認できた。従来から広く用いられている抗血小板剤アスピリンとの比較では、オルボフィバンはより強力な抗血栓作用を示したが、出血に対する危険性は同程度であった。また、高脂血症モルモットでの抗血小板作用の検討から、オルボフィバンの作用には個体差が小さい可能性が示された。これらの薬理学的性質を有するオルボフィバンは有用な抗血小板剤となりうることが示された。

#### コラーゲン、ADP、TRAP による血小板放出反応における GPIIb/IIIa の関与<sup>4)</sup>

血小板のフィブリノーゲン受容体である GPIIb/IIIa は血小板凝集に重要な役割を担っている。血小板放出反応のメカニズムにおける GPIIb/IIIa レセプターの役割について、ヒト血小板  $\alpha$  顆粒からの PDGF (platelet-derived growth factor)、 $\beta$ -TG ( $\beta$ -thromboglobulin) および P-selectin 放出を指標に検討した。コラーゲン、ADP および TRAP (thrombin receptor agonist peptide) 刺激により凝集反応存在下 (攪拌条件) では、ほぼ一様に PDGF と  $\beta$ -TG の最大放出反応が引き起こされることが確認できた。それぞれ最大放出反応を引き起こす高濃度のアゴニストで刺激したときの放出反応に対する GPIIb/IIIa 拮抗薬であるオルボフィバン活性体および abciximab の効果を検討したところ、コラーゲン-惹起放出が完全に、ADP-惹起放出が部分的に抑制されたのに対し、TRAP-惹起放出は全く抑制されなかった。さらに凝集反応非存在下 (非攪拌下) では、コラーゲン、ADP および TRAP 刺激により約 10、30 および 90% の P-selectin 陽性細胞が検出でき、それぞれの陽性率は攪拌条件且つ GPIIb/IIIa 拮抗薬存在下での放出量とほぼ一致した。刺激剤によって放出反応の凝集依存性の割合は異なり (Figure 6)、コラーゲンおよび ADP ではそれぞれほぼ完全および部分的に凝集反応依存性であるのに対して、TRAP では凝集反応非依存性であることが示された。

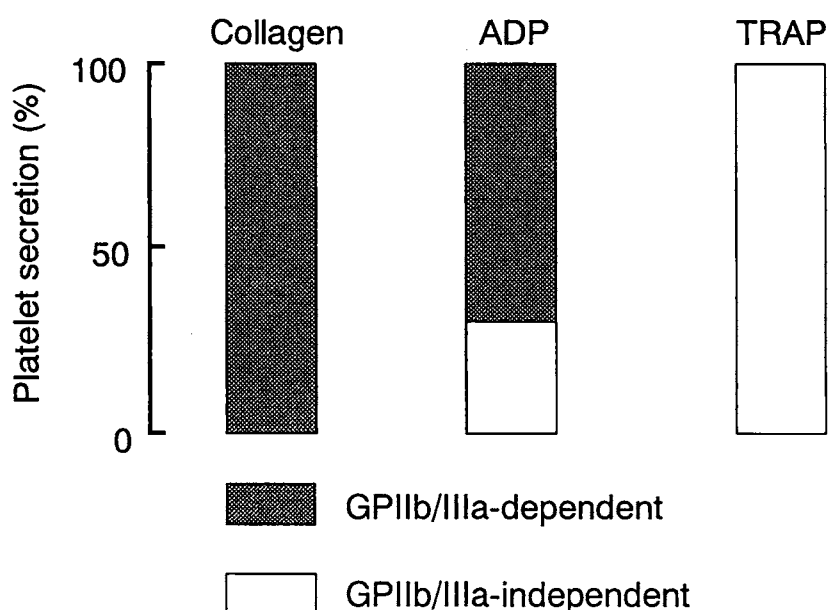


Fig. 6 Contribution of GPIIb/IIIa-dependent and -independent responses to maximal platelet secretion induced by collagen, ADP and TRAP.

以上、血小板放出反応について病態 (動脈硬化症) との関連、放出 5-HT の機能、放出反応のメカニズムについて明らかにした。これらの成果は、抗血栓薬の開発、更なる血小板活性化メカニズムの解明に深く貢献するものと考える。

## 文献

- 1) T. Ogawa, A. Sugidachi, F. Asai and H. Koike, Reduced platelet serotonin content in rabbits with dietary hypercholesterolemia. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, **11**: 313-319 (2000)
- 2) T. Ogawa, A. Sugidachi, F. Asai and H. Koike, Involvement of platelet-derived 5-hydroxytryptamine in thromboxane A<sub>2</sub>-induced aggregation in cat platelets. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, **9**: 233-240 (1998)
- 3) T. Ogawa, A. Sugidachi, H. Naganuma and F. Asai, Antiplatelet and antithrombotic effects of orbofiban, a new orally active GPIIb/IIIa antagonist, in guinea pigs. *Thrombosis Research*, **97**: 307-315 (2000)
- 4) 投稿準備中

## 学位論文審査結果の要旨

止血や血栓形成に中心的な役割を果たす血小板は、活性化されて様々な生理活性物質を放出するが、血小板放出反応の詳細については不明であった。本申請者が提出した論文は、血小板放出反応に関してウサギ、ネコ及びヒト血小板を試料として用い、動脈硬化症発症との関連、血小板凝集におけるポジティブフィードバック的な役割、放出反応メカニズムなどについて検討した結果を述べたものである。

申請者はウサギにコレステロールを負荷することにより「血清コレステロール上昇」→「血小板凝集能亢進」→「血小板内 5-HT (5-hydroxytryptamin) 含量低下 (血小板放出反応)」→「動脈硬化病変形成」の順に病態が変化することを見出した。5-HT は動脈硬化病変形成作用を有することから、動脈硬化症発症に血小板放出反応が関与していることが本研究から明らかになった。

また、ネコ血小板を TXA<sub>2</sub> (thromboxane A<sub>2</sub>) あるいは PAF (platelet activating factor) で刺激すると、放出反応を伴った 2 相性の凝集反応が惹起され、この凝集は 5-HT 拮抗薬により抑制される結果を得た。微量の 5-HT は TXA<sub>2</sub> あるいは PAF との併用により相乗的な凝集反応を惹起した。これらの結果から、TXA<sub>2</sub> および PAF 惹起血小板凝集には血小板から放出された 5-HT が重要な役割を果たしていることが示された。

さらに、攪拌下 (凝集存在) で、ヒト血小板をコラーゲン、ADP (adenosine 5'-diphosphate) および TRAP (thrombin receptor agonist peptide) で刺激することにより同程度の放出反応が引き起こされる結果が得られた。一方、非攪拌下 (凝集非存在) における放出反応の程度はコラーゲン > ADP >> TRAP の順となり、各種の刺激剤による放出反応への凝集の寄与の程度は異なることを明らかにした。

以上、本論文は血小板放出反応について動脈硬化症発症との関連、放出 5-HT の機能並びに凝集反応の寄与などこれまで不明であった諸点を明らかにしたものであり、臨床応用可能な新規薬剤の開発の基礎となる重要な知見をもたらした意義を認め、本論文は博士 (薬学) 論文に値すると判定した。